

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-504147

⑬ 公表 平成5年(1993)7月1日

⑭ Int.Cl.⁵
C 07 K 1/04

識別記号

庁内整理番号
8318-4H審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門(区分) 3(2)

(全5頁)

⑮ 発明の名称 複数のポリペプチドの同時合成方法及び装置

⑯ 特 願 平3-504203

⑰ 出 願 平3(1991)2月20日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)8月24日

⑲ 国際出願 PCT/EP91/00318

⑳ 国際公開番号 WO91/13084

㉑ 国際公開日 平3(1991)9月5日

優先権主張 ㉒ 1990年2月22日 ㉓ ドイツ(DE) ㉔ P4005518.3

㉕ 発 明 者 シュノルレンベルク ゲルト ドイツ連邦共和国 デー6535 ガウ アルゲスハイム エルンシュ
ト ルートヴィツヒ シュトラーセ 66アー㉖ 発 明 者 クナツプ ヴイルヘルム ドイツ連邦共和国 デー6537 ゲンジンゲン ヴインツェルシュト
ラーセ 5㉗ 出 願 人 ベーリンガー インゲルハイム ドイツ連邦共和国 デー6507 インゲルハイム アム ライン ポ
コマンデイトゲゼルシャフト ストファツハ 200

㉘ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外6名

㉙ 指 定 国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域
特許), F R(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広
域特許), S E(広域特許), U S

請 求 の 範 囲

1. 複数の反応容器とこれらの反応容器用の保持装置とを含み、これらの反応容器は頂部と底部で開放されており、個々の反応容器の底部開口はフィルターでカバーされており、保持装置は、不活性ガス供給ラインおよび吸引装置用の潜在的連結部、および各反応容器の頂部開口が合成工程において必要とする液体の添加に対して上から受入れ可能でありかつ各反応容器の底部開口が保持装置の内部と連結するような方法で各反応容器を固定する開口とを有する密閉可能な容器であることを特徴とする固相合成法による複数のポリペプチドの同時合成用の装置。
2. 保持装置がプレート状カバーを有するタイプ容器であり、このカバーが複数の開口を有し、これら開口の各々が反応容器を保持することを特徴とする請求項1記載の装置。
3. 各反応容器が円筒状ガラス容器であり、その下部末端に保持装置に挿入させるすりガラス部分を有することを特徴とする請求項1又は2記載の装置。
4. 各反応容器の底部開口を覆うフィルターがフリットガラスフィルターまたはフリットテフロンフィルターであることを特徴とする請求項1〜3のいずれか1項記載の装置。
5. 合成過程において必要とする各液体をディペッティングロボットによって各反応容器中に導入することを特徴とする請求項1〜4のいずれか1項記載の装置。
6. 請求項1〜5のいずれか1項に記載の装置を用い、高分子担体材料または第1のアミノ酸またはペプチドを装填した高分子担体材料を各反応容器に入れ、次いで、ペプチドを各反応容器内でそれ自体は公知である固相合成法によって合成し、必要に応じて、ペプチドの遊離のアミノ基および/またはヒドロキシ基をアシル化し、個々の工程で必要とする試剤と洗浄液をカニュレを有する1本以上のロボットアームにより対応する貯蔵容器から各反応容器に導入し、試剤または洗浄液の所定の滞留時間後に、フィルター上の各反応容器内に含有させた液体を保持装置を通して同時に吸出し、工程の個々の段階を上記ロボットに接続したコンピューターのプログラムによって制御することを特徴とする固相合成法による複数のポリペプチドの同時合成方法。
7. 液体を吸引する場合を除いた合成過程全体に亘って、不活性ガスを保持装

置中にポンプ注入し、この不活性ガスを液体が反応容器内のフィルターを通して流出するのを防止するような低圧に保つことを特徴とする請求項6記載の方法。

明 細 書

複数のポリペプチドの同時合成方法及び装置

レセプター結合性試験による生物学的活性ペプチドの構造/活性因子の緊急の評価あるいはペプチドおよび蛋白質の免疫学上のエピトープの緊急の決定においては、比較的少量(20mg未満)の複数のペプチドを必要とする。これらのペプチドは固相ペプチド合成により調製するのが好都合である。この合成は、R. B. メリフィールドによって開発された方法[ニューヨークのGross, Meienhofer Academic Press社によって発行されたG. Barany, R. B. Merrifield, The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 2, 3-284 (1980)]に基づいており、ペプチド鎖を1つ1つ合成している。その合成工程は次のように要約し得る:

- ペプチド鎖の第1アミノ酸をアンカー基を介して高分子担体に結合させる、
- ペプチド鎖の残りのアミノ酸について1つ1つ結合させる、
- 洗浄、保護基の開裂および中和からなる個々の結合間の中間工程、
- 必要に応じて、末端アミノ基をアシル化する、
- ペプチドを担体から開裂させる。

このペプチド合成においては、アミノ酸当たり18時間までの通常4時間までの時間を合成に掛けねばならない。(個々の結合は1〜2時間の反応時間を通常要し;各結合間においては、約10の中間工程を一般に必要とし、各中間工程は約2〜15分を要するであろう)。従って、多数のアミノ酸からなるペプチドの調製は極めて面倒で労力を要し費用高である。

固相ペプチドの固相合成法は、R. A. ハーウテンにより開示されている(Pat. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 82, 5131-5135, 1985年8月, Immunology)。この方法によれば、合成用の高分子担体は多孔質ポリプロピレンバッグに50〜100mgのパッチで詰め込み、各バッグを溶融密封し、合成に共通する中間工程(洗浄、中和、保護基の開裂)は全てのバッグについて1つの反応容器内で同時に行い、個々の結合は別個に行う。この方法はペプチド シンセサイザーを用いて手動または部分自動化によって行い得る。

上述の方法の欠点は、バッグの取扱がむしろ煩わしく、バッグを再使用できず、

各バッグを異なるペプチドの合成においては互いに分離しなければならず、さらに、対照サンプルを合成全体に亘って採取できないことである。

ドイツ特許出願NO. P 38 28 576.2 号およびG. SchnorrenbergとH. Gerhardtとによる刊行物、Tetrahedron Vol. 45, No. 24, 7759-7764, 1989は、多数のポリペプチドを自動的に同時に合成せしめる方法と装置を記載しており、上述の欠点を回避している。上述の固相合成法を改良して適当に改造したビベッティングロボットの助けによって実施することができるようにしている。従来、ビベッティングロボットは連続分析に用いられている。例えば、テカン(TECAN)社製のビベッティングロボット、RSP 5052 を用いることができる。ビベッティングロボットは以下の外部コンポーネントを有する: 計量ビベットを有する少なくとも1個のアーム、貯蔵容器を有するクランプ、および96個以下のウェルを含むマイクロタイター プレート。ロボットアームは試料を貯蔵容器から運び、試料をマイクロタイター プレートの個々のウェルに入れ、必要に応じて、ウェルから液体を吸引する。計量ビベットのキャニュールは頂部から底部までの仕切壁により2つの部分に分割するように構築し得る。(この仕切壁により、1個のアームで、2つの異なる計量量を供給するかあるいは1つの量を供給し1つの量を吸い出すことができる)。この装置の作業パターンはコンピュータプログラムにより制御し得る。上述のドイツ特許出願NO. P 38 28 576.2 号によれば、この種のビベッティングロボット内での固相ペプチド合成は次のようにして行う:

担体材料(好ましくは、粒状化担体材料)をマイクロタイター プレートの各ウェル内に入れる。担体材料は初期量の所定ペプチドと一緒に装填し得る。反応と洗浄工程に必要な液体を装置の貯蔵容器内に準備のために保つ。合成終了時にペプチドを担体から分離させる場合および/または遊離のアミノ酸をアシル化する場合、これらの反応に必要な試料も貯蔵容器内に準備のために保つ。所要反応時間は、96個以下のウェルを含むマイクロタイター プレートを使用することが推奨され得ることを示唆している。従って、最高96種のポリペプチドを1つのプログラム操作によって合成し得る。これらのペプチドの合成に適合するようにしたプログラムによれば、ビベッティングロボットにより、個々のウェル内に試料と洗浄液を導入し、所定の滞留時間後に、担体から上清液を吸い出す。

この方法およびこの方法への装置の必要な適合化は、Messrs. TECAN社製の2本アーム型ビベッティングロボット RSP 5052に852してより詳細に説明されている。しかしながら、この方法の応用はこの装置に限定されていない。異なる構築のビベッティングロボット、特に、1本または多数本アーム型も本発明の方法に適合し得る。96ウェルを有するマイクロタイター プレートを使用する。1つのウェルは、例えば、アミノ酸と一緒に装填し得る10mgの樹脂を含有し、また300μl以上の液体を保持するであろう。この樹脂量は約5μモルのアミノ酸に相当するかまたは約5μモルのペプチドの調製に適する。ポリスチレンまたはポリアクリルアミド系の通常の担体材料を使用し得る。20個以下のアミノ酸を含有するペプチドを合成するのが好ましい。これに必要な試料溶液と洗浄液はこの目的のために備えた貯蔵容器内で調製する。装置のアーム1に、計量ビベットと、すずぎ装置を有する吸引チャンネルを有するアーム2とを備え付ける。このすずぎ装置は好ましくは使用する溶媒用に別個に設置する貯蔵容器に連結する。合成は付属PCのプログラムに従って行う。アーム1は開放貯蔵容器から採取するすべての試料溶液を計量する。計量ビベットが1つの試料溶液から次の試料溶液に変わる前に、計量ビベットを溶媒で特定のすずぎ位置内ですすぐ。アーム2はフィルターをはめたキャニュールを通して試料と洗浄液を吸い上げる。樹脂の損失と隣接ウェルの汚染を防止するために、このキャニュールの外側を、各吸引工程後に、この外面に取り付けたラインによって溶媒ですすぐ。次の洗浄工程はこの溶媒により同時に開始させる。次いで、キャニュールをキャニュールすずぎ位置ですすぐ。ペプチドを樹脂から分離するためには、例えば、トリフルオロ酢酸をアーム1から各ウェル中へ導入する。開裂させた後、溶液を吸引キャニュールで吸い上げて第2のマイクロタイター プレートに移し、次いで、そこから溶液を仕上処理する。

上記の装置は複数のポリペプチドの自動同時合成を行うのを可能にする。しかしながら、1つの満足できない点は液体を完全に吸い上げることができないことおよび試料と洗浄液を吸い上げるのに比較的時間を要することである。本発明はこれらの欠点を克服する。さらにまた、25μmolまでのペプチドを反応容器を変えることなく合成し得る。

本発明は、複数の反応容器とこれらの反応容器用の保持装置とを含み、これらの反応容器は頂部と底部で開放されており、個々の反応容器の底部開口はフィルターでカバーされており、保持装置は、内部ガス供給ラインおよび吸引装置用の潜在的連結部、および各反応容器の頂部開口が合成工程において必要とする液体の添加に対して上から受入れ可能でありかつ各反応容器の底部開口が保持装置の内部と連結するような方法で各反応容器を固定する開口とを有する密封可能な容器であることを特徴とする固相合成法による複数のポリペプチドの同時合成用の装置に関する。

本装置は、例えば、上述したビベッティングロボットと一緒に操作し得る。

本発明は、さらに、上記の装置を用いての固相合成法による複数のポリペプチドの同時合成方法にも関し、この方法は、高分子担体材料または第1のアミノ酸またはペプチドを装填した高分子担体材料を各反応容器に入れ、次いで、ペプチドを各反応容器内でそれ自体は公知である固相合成法によって合成し、必要に応じて、ペプチドの遊離のアミノ基および/またはヒドロキシ基をアシル化するかおよび/またはペプチドをその後その担体材料から分離し、個々の工程で必要とする試料と洗浄液をキャニュールを有する1本以上のロボットアームにより相応する貯蔵容器から各反応容器に導入し、試料と洗浄液の所定の滞留時間後に、フィルター上の各反応容器内に含有させた液体を保持装置を通して同時に吸い出し、プロセスの個々の段階を上記ロボットに接続したコンピュータのプログラムによって制御することを特徴とする。好ましい実施態様においては、液体を吸い出す局面を除いては不活性ガスを合成工程全体に亘って保持装置にパイプ注入し、この不活性ガスを液体が反応容器内のフィルターを通して流出するのを防止するような低圧下下保つ。

上記装置の好ましい実施態様においては、保持装置はプレート状カバーを有するタブ型容器からなり、このカバーは複数の開口を有し、各開口が反応容器を保持する。

保持装置と各反応容器はガラス、金属(好ましくは、ステンレススチール)、ポリプロピレン、テフロンまたはポリアミド66、またはこれらの組み合わせから有利に製造する。

保持装置と各反応容器は互いに適合して各反応容器が保持装置内にしっかりと合うようにすべきである。このことは、例えば、各反応容器を保持装置中にねじ込むかまたははめ込むことによって達成し得る。装置の好ましい実施態様においては、保持装置のカバーは適当な円錐状開口を有し、好ましくは、テフロンまたはポリアミド66から製造する。各反応容器は円筒状ガラス容器であり、保持装置内に挿入させたすりガラス部分を底部に有する。反応容器の底部開口を覆うフィルターはフリットガラスフィルターまたはフリットテフロンフィルターである。(有利なのはフリットテフロンフィルターをはめ込むかまたは押し込む底部内孔を有する反応容器を用いることである。合成サイクル終了後、これらのフリットフィルターは新しいものと交換し得る。)

本発明による装置を前述のビベッティングロボットと一緒に操作するときには、48個以下の反応容器を有する装置を構築することを推奨する。

しかしながら、本発明方法の応用はこの装置に限定されない。異なる構造のビベッティングロボット、特に1本アーム型または多数本アーム型のロボットも本発明の方法に適応し得る。

本発明方法を実施するためには、例えば、10〜50mgの樹脂を各反応容器に入れる。この樹脂量は約5〜25μモルのアミノ酸に相当するかまたは約5〜25μモルのペプチドを調整するのに適する。ポリスチレンまたはポリアクリルアミド系の通常の担体材料を使用し得る。30個以下のアミノ酸を含有するペプチドを合成することが推奨される。これに必要な試料溶液と洗浄液はこの目的のために設けた貯蔵容器内で調製する。ビベッティングロボットのアームは計量ビベットと適合させる。合成は接続PCのプログラムに従って行う。この方法で、試料溶液すべてを、テフロン仕切りで密閉した貯蔵容器から取り出して計量する。計量ビベットが1つの試料溶液から次の試料溶液に変わる前に、計量ビベットを特定のすくい位置で溶媒ですすぐ。必要な洗浄液は同様にして導入する。所要ペプチドの担体材料からのトリフルオロ酢酸を用いての取り出しは自動的にまたは手動的に同様にして行い得る。

特定の反応または洗浄工程における反応容器からのすべての液体吸出しは、保持装置に取り付けた吸引装置(例えば、水噴射ポンプまたは膜ポンプ)により

全反応容器内で同時に行う。

一般的には、DMFまたはN-メチルピロリドンを溶媒として用いる。従って、各反応容器と備え付けたすべての洗浄装置は、耐溶媒性の材料、例えば、ガラス、テフロンまたはポリエチレンから製造しなければならない。標準の市販装置においては、計量ビベットはステンレススチール製である。この材料は本発明の方法においても適し得る。

本発明方法は、例えば、次の方法によって実施する(ウェル当たりの量): 出発物質はFmoc-アミノ酸を装填した樹脂(粒度200〜400メッシュ)であり; Fmoc-保護アミノ酸は各ウェルのカップリング工程において1.0倍までの過剰で用いる、即ち、50μモルのFmoc-アミノ酸と50μモルの1-ヒドロキシベンゾトリアゾールのDMF溶液200μlと75μモルのN,N-ジシクロヘキシル-カルボジミドのDMF溶液100μlを加え; カップリング時間は約1時間である。Fmoc保護基をDMF中ピペリジン40%溶液300μlで開裂させる。開裂時間は約20分である。洗浄工程は各々300μlのDMFで行う。

遊離基(NH₂、OH)のアシル化は、適当な酸無水物、例えば、無水酢酸とピリジンとを加えることによって同様にして行い得る。これらの反応を終えた後、溶液を吸引濾過し処理用採取する。

最終ペプチドはトリフルオロ酢酸の手動での添加により各反応容器内で担体から分離し得る(20分の反応時間)。各ペプチドは別々に単離する。上記の説明から明白であるように、ペプチド合成のすべての工程を開放容器で行う。本発明による合成方法は、それにもかかわらず、ペプチドが極めて高純度で生成する。

図1〜3は本発明の装置の1例を図式的に示す。

図1はタブ(2)とカバー(1)からなる保持装置を示す。タブ(1)はカバー(2)により、好ましくはタブのフランジをカバーにネジ付けするネジ蓋により強固に密閉し得る。カバー(1)は表面全体に亘って等間隔で配列させた開口(3)を有する。(図は幾つかの開口のみを示している)。反応容器(4)をこれらの開口に挿入する。本発明の方法をカバーの開口よりも少ない数の反応容器で実施する場合、使用しない開口はすりガラスストッパーにより密閉する。

2個の連結部(5)と(6)をタブ(2)の壁に設ける。連結部(5)は吸引

装置に接続し、連結部(6)は不活性ガスの供給用として働く。

図2は保持装置の好ましい実施態様の断面を示す。この装置は、連結部(5)の丁度真下に、タブ(2)内に第2の基部のように取付けたガイドバン(7)を含む。このガイドバンは連結部(5)に向かって僅かに傾斜するように配置させて吸い出した液体すべてを完全に排出させるようにする。

図3は反応容器の概略図を示す。容器の上部は円筒状である。容器の下部は先細りし、すりガラス部分(9)にしっかりと連結されている。反応容器の底部開口はフリットガラスまたはフリットテフロンフィルター(8)によりカバーされている。

この実施態様においては、タブ(2)は金属(好ましくは、V2aスチール)から作られ、カバー(1)はテフロンまたはポリアミド66から作られ、反応容器(4)はガラスから作られている。開口(3)は円錐状であり、反応容器のすりガラス部分(9)の正確な大きさに相応する。フィルター(8)はフリットガラスフィルターG2またはG3、あるいはG、T、ペーカー ケミカルエン社(Dee-6080, Grob-gerau)により注文番号7329/03として製造されたフリットテフロンフィルターである。本発明の装置をテカン社により製造されたビベッティングロボット、RPS 5052と一緒に用いる場合、タブ(2)は便宜上約165×127×45(mm)の寸法で製造する。その場合、各反応容器は約70mmの高さを有し、その約25mmはフリットガラスフィルター上の円筒状部分からなる。この上部部分の直径は13mmである。48個以下の反応容器用の装置を構築するのが有利である。

保持装置は連結部(5)を介して吸引装置、例えば、前の方に5リットルの吸引びんを有する膜ポンプと接続する。保持装置はまた連結部(6)を介して不活性ガス供給源(例えば、窒素ガスびん)とも接続する。圧力開放バルブ(通常約0.1バールにセットされている)はこのラインに設置する。例えば、PCによって調整可能な調整手段もこのラインに設ける。

本装置の別の実施態様は、タブ(2)が1個のみの連結部を有してこの連結部をPC制御可能な3つ口バルブにより2つのライン(不活性ガス/吸引手段)に接続するように構築する。

実施例

以下の実施例は本発明方法の過程を具体的に説明するものである: 上述の装置をビベッティングロボットと一緒に使用する。工程はコンピューター制御する。保護アミノ酸または短ペプチドをすでに装填させた担体材料を各反応容器に入れる。

合成サイクルの役割

工 程		操 作
1	バルブN ₁ 開放、真空遮断	
2	DMFの計量(3分)	洗浄
3	バルブN ₁ 遮断、真空開放	吸引
4	バルブN ₂ 開放、真空遮断	
5	DMF中40%ピペラジンの計量(3分)	保護基の開裂
6	バルブN ₂ 遮断、真空開放	吸引
7	バルブN ₂ 開放、真空遮断	
8	DMF中40%ピペラジンの計量(3分)	保護基の開裂
9	バルブN ₂ 遮断、真空開放	吸引
10	バルブN ₁ 開放、真空遮断	
11	DMFの計量(30秒)	洗浄
12	バルブN ₁ 遮断、真空開放	吸引
13	バルブN ₁ 開放、真空遮断	
14〜40	工程11〜13の繰り返し	洗浄(8回)
41	DMF中での所望Fmocアミノ酸/HOBtの計量	第1カップリング
42	DIC/DMFの計量(40分)	第1カップリング
43	バルブN ₂ 遮断、真空開放	吸引
44	バルブN ₂ 開放、真空遮断	
45〜48	工程41〜44の繰り返し	第2カップリング

前述したドイツ特許出願NO. P 38 28 576.2 号による方法および装置と比較して、本発明による装置は合成サイクルに要する時間を実質的に（約半分に）短縮している。合成は、使用液体を完全に吸い上げるので、信頼性があり清淨である。合成の過程は、各反応容器が開放であるので、容易にモニターできる。

FIG. 1

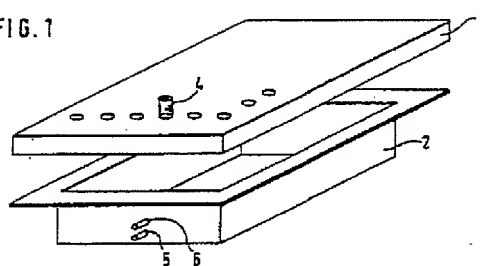


FIG. 2

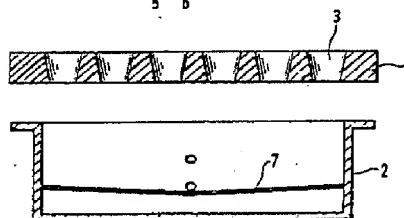
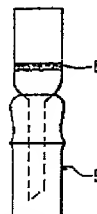


FIG. 3



ERSATZBLATT

要 約 査

48種までのポリペプチドを自動ピペット中で固相合成法によって調製し得る複数のポリペプチドの全自動同時合成方法および装置。この装置は個々のポリペプチド合成用の個々の反応容器を有し、これらの反応容器は保持装置により一緒になって1個のユニットを構成するようにする。各反応又は洗浄工程後の各反応容器からの液体の同時抽出が保持装置を介して生ずる。

國際調查報告

II. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Classification No.	
According to International Patent Classification (IPC) or to such National Classification and IFC:		PCT/EVP 91/00318	
Int. Cl. ⁵		G 07 K 1/04	
A. FIELD SEARCHED		Main Document(s) Searched¹	
Classification System	Classification Symbol		
Int. Cl. ⁵	G 07 K	<p>Document(s) Searched after this Main Document</p> <p>is the Event that such Document(s) are indicated by the Field Searched?</p>	
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT²			
Category³	Citation of Document,⁴ with indication, where appropriate, of the relevant passage⁵	Related to Class No. 18	
P, X	DE, A1. 3828576 [BOEHRINGER INGELHEIM KG] B March 1990 (08.03.90), see claim 1	6	
X	TETRAHEDRON; vol. 45, No. 24, 1989, SCHNORRENBURG at 3. "Fully Automatic Simultaneous Multiple Peptide Synthesis in Micromolar Scale-Rapid Synthesis of Series of Peptides for Screening in Biological Assays", pages 7759-7764; see the whole document	1-5	
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 82, No. 15, August 1985, R. A. HOUGHTEN "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids", pages 5131-5135; see the whole document	5	

<p>* Special categories of total documents 18</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular interest</p> <p>"X" documents that do not pass on or after the international filing date</p> <p>"Y" document which has been given an official citation or which is cited in connection with the examination of an application or of an official search report</p> <p>"Z" document relating to an oral presentation, oral information or other document</p> <p>** Documents published prior to the international filing date but later than the priority date (see 18)</p> <p>** Later document published after the international filing date in a priority filed up in conformity with the conditions but lead to converting the principle or theory underlying the invention</p> <p>** Abstracts of previous substance (the claimed invention) must be substantiated prior or cannot be considered as inventive in themselves</p> <p>** Publication of articles (abstracts) the claimed invention against the background is included as reference data in the literature It correlates with some more or less detailed material, such comparison being allowed to a person skilled in the art</p> <p>** Document mentioning of the same subject matter</p>			
IV. CERTIFICATION		Date of Issuing of this International Search Report	
Date of the Actual Completion of the International Search		5 June 1991 (05.06.91)	
7 May 1991 (07.05.91)			
Inventor(s) Signifying Authority		Signature of Authorized Officer	
European Patent Office			

ANNEXE
zur internationalen Recherchen-
bericht über die internationale
Patentanmeldung Nr.

ANNEXE
to the International Search
Report to the International Patent
Application No.

ANNEXE
au rapport de recherche inter-
national relatif à la demande de brevet
international n°

PCT/JP91/00019 SMC 84408

In diesem Anhang sind die Mitglieder
der Patentfamilie der in obenge-
nannten internationalen Recherchenbericht
angeführten Patentdokumente angegeben.
Diese Angaben dienen nur zur Unter-
richtung und erheben ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family
members relating to the patent documents
cited in the above-mentioned inter-
national search report. The Office is
in no way liable for these particulars
which are given merely for the purpose
of information.

La présente annexe indique les
membres de la famille de brevets
relatifs aux documents de brevets cités
dans le rapport de recherche inter-
national visé ci-dessus. Les renseigne-
ments fournis sont donnés à titre indica-
tif et n'engagent pas la responsabilité
de l'Office.

in Recherchenbericht angeführte Patentdokumente Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied der Patentfamilie Patent family member Membre de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
DE-A1- 3828576	08-02-90	AU-A1-40130/B9	01-03-90
		DE-C2- 3828576	22-11-90
		DK-A1- 4127/B9	22-08-89
		DK-A - 4127/B9	24-02-90
		EP-A2- 355582	28-02-90
		EP-A2- 355582	22-11-90
		JP-A2- 2167297	27-06-90
		DE-U1- 8816749	21-06-90